



(11) **EP 1 285 069 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
13.08.2008 Bulletin 2008/33

(51) Int Cl.:
C12N 15/31 (2006.01) **C07K 14/335** (2006.01)
A23L 3/3463 (2008.01) **A23L 3/3571** (2006.01)

(21) Numéro de dépôt: 01938357.9

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR2001/001642

(22) Date de dépôt: 28.05.2001

(87) Numéro de publication internationale:
WO 2001/092533 (06.12.2001 Gazette 2001/49)

(54) **BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA**
BAKTERIOCIN GEGEN LISTERIA
ANTI-LISTERIA BACTERIOCIN

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR

(30) Priorité: 29.05.2000 FR 0006859
19.10.2000 FR 0013407

(43) Date de publication de la demande:
26.02.2003 Bulletin 2003/09

(60) Demande divisionnaire:
08101852.5 / 1 927 661

(73) Titulaire: **DANISCO A/S**
1411 Copenhagen K. (DK)

(72) Inventeurs:
• **BERJEAUD, Jean-Marc**
F-86800 Savigny l'Evescault (FR)
• **FREMAUX, Christophe**
F-86600 Poitiers (FR)
• **CENATIEMPO, Yves**
F-86800 Saint Julien l'Ars (FR)
• **SIMON, Laurence**
F-86370 Vivonne (FR)

(74) Mandataire: **Nargolwalla, Cyra et al**
Cabinet Plasseraud
52 rue de la Victoire
75440 Paris Cedex 09 (FR)

(56) Documents cités:
• **HUGAS M ET AL:** "Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" **FOOD MICROBIOL.**, vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847
• **AXELSSON L ET AL:** "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOCIN FROM *LACTOBACILLUS SAKE* LB706" **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, US, WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 avril 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193
• **HUEHNE KATHRIN ET AL:** "Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sakei* Lb674 and its expression in sakacin-negative *Lb. sakei* strains." **MICROBIOLOGY (READING)**, vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872

EP 1 285 069 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

- [0001] La présente invention concerne une bactériocine de *Lactobacillus sakei* et plus particulièrement de *Lactobacillus sakei* 2512, une séquence nucléotidique codant pour cette bactériocine, et l'utilisation industrielle de cette bactériocine comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.
- [0002] Les bactéries lactiques sont utilisées intensivement dans les fermentations alimentaires afin, non seulement d'améliorer la saveur et la texture des aliments mais surtout pour allonger leur durée de conservation. De nombreuses bactéries lactiques ont en effet la faculté d'inhiber la croissance de certaines bactéries à Gram positif, dont des souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, grâce à l'excrétion de molécules antagonistes, parmi lesquelles des composés peptidiques. Ces composés peptidiques, appelés bactériocines, présentent donc un potentiel intéressant pour la préservation qualitative et sanitaire de produits alimentaires fermentés.
- [0003] A titre représentatif de ces bactériocines, on peut notamment citer celles formant la sous-classe de polypeptides dénommés bactériocines anti-*Listeria*, bactériocines de classe IIa (Ennahar S. et al., 2000, FEMS Microbiol. Rev., 24 : 85-106) et cystibiotiques (Jack R. et al., 1995, Microbiol. Rev., 59(2) : 171-200). Il a été fait récemment état de l'utilisation potentielle d'une de ces bactériocines de classe IIa, la divercine V41, pour empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé (Duffes F. et al., 1999, J. Food Prot., 62(12) : 1394-1403).
- [0004] Les séquences de ces polypeptides présentent de fortes similitudes dans leur partie N-terminale, avec en particulier la présence d'un pont disulfure. La partie C-terminale hydrophobe est beaucoup plus variable, toutefois certaines de ces bactériocines, dites de type pédiocine (pédiocine PA-1, entéroïne A et divercine V41), se caractérisent par une taille supérieure à 40 résidus et la présence d'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.
- [0005] Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle bactériocine de classe IIa produite à partir d'une souche spécifique de *Lactobacillus sakei*, qui s'avère particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.
- [0006] En accord avec Tagg J.R. et al., Bacteriol. Rev., 40 : 722-756 (1976), le terme "Bactériocine" au sens de l'invention fait référence à un polypeptide produit, par synthèse ribosomique, à partir de microorganismes, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres bactéries.
- [0007] Hugas et al., Food Microbiol, vol. 15, 1998, pages 639-650 décrit l'isolement de la Sakacine K de *Lactobacillus sakei* CTC 494 et son utilisation pour empêcher la croissance et la propagation de *Listeria monocytogenes* dans des produits alimentaires.
- [0008] La présente invention a donc pour premier objet un polypeptide issu de la souche *Lactobacillus sakei* 2512, doté d'une activité bactériocine.
- [0009] La souche *Lactobacillus sakei* 2512 a été déposée le 25 mai 2000 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes où elle est enregistrée sous le numéro de dépôt I-2479.
- [0010] La bactériocine objet de la présente invention a été dénommée Sakacine G. Il s'agit d'un polypeptide possédant une masse moléculaire de l'ordre de 3700 à 3900 et préférentiellement d'environ 3834 Da déterminée par spectrométrie de masse. Elle possède un spectre d'inhibition bactérienne très apparenté à celui des bactériocines de Classe IIa. C'est ainsi qu'elle s'avère particulièrement efficace contre les souches de *Lactobacillus sakei* autres que le *Lactobacillus sakei* 2512, *Pediococcus cerevisiae*, l'ensemble des souches *Listeria* et contre les *Enterococcus faecalis* et *durans*. En revanche, elle s'avère inactive contre les autres espèces de *Lactobacillus* comme par exemple le *Lactobacillus debrueckii*, le *Lactobacillus plantarum*, le *Lactobacillus brevis*, le *Lactobacillus casei*, et une souche d'*Enterococcus faecium*.
- [0011] A l'image des bactériocines anti-*Listeria* de type pédiocine, la Sakacine G possède dans sa structure peptidique avantageusement deux ponts disulfures.
- [0012] Une analyse des déterminants génétiques de plusieurs bactériocines de classe IIa a montré que les gènes impliqués dans leurs production, transport et immunité, sont organisés en une ou plusieurs structures de type opéron. Ces opérons ont une localisation souvent plasmidique et possèdent généralement au moins deux gènes codant pour des protéines, homologues à un ABC-transporteur et une protéine accessoire, probablement impliquée dans l'export des bactériocines.
- [0013] Le clonage du fragment nucléotidique contenant le gène de la Sakacine G a révélé l'existence de trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgDc* (SEQ ID N°13) (incluant le cadre de lecture tronqué *skgD* (SEQ ID N°7)) et d'un cadre tronqué *skgI* (SEQ ID N°5) dont une représentation schématique est présentée en figure 1. Le fragment nucléotidique est un double brin dont le monobrin 5'-3' est représenté en séquence ID N°15.
- [0014] Les produits des gènes *skgA1* et *skgA2*, appelés pré-bactériocines, peuvent subir une maturation au cours de laquelle leurs peptides leaders respectifs sont clivés entre les résidus 18 et 19, libérant ainsi la Sakacine G active (résidus 19-55).
- [0015] Le fragment nucléotidique monobrin 5'-3' comprenant *skgA1*, *skgA2*, *skgD* et *skgI* figure en SEQ ID N°9.
- [0016] La présente invention a donc également pour objet un polypeptide isolé correspondant à une bactériocine,

caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4. La séquence de la bactériocine mature correspond à la séquence ID N°12 et est comprise dans les séquences ID N°2 et ID N°4.

[0017] Le cadre de lecture appelé *skgl* code une protéine de 52 résidus. La comparaison de cette séquence avec celle des banques de données montre de fortes similitudes de *Skgl* avec des protéines dites d'immunité. Elle code vraisemblablement la protéine d'immunité protégeant la bactérie productrice de la Sakacine G.

[0018] La présente invention s'étend également à un polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°6 correspondant au cadre de lecture *skgl*.

[0019] En ce qui concerne le dernier gène *skgDc*, il code une protéine qui présente une homologie avec des protéines de la famille des ABC-transporteurs, et plus particulièrement du transporteur de la pédiocine PA-1. Le gène *skgDc* code vraisemblablement l'ABC-transporteur spécifique de la Sakacine G.

[0020] La présente invention s'étend également au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°8 correspondant au gène dit *skgD* et au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°14 correspondant au gène dit *skgDc*.

[0021] Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme

- i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N°6, N°8, N°12, ou N°14 ; ou
- ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie ci-après c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence SEQ ID N° 1, N° 3, N° 5, N° 7, N° 9, N°13 ou N°15 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

[0022] Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés des séquences homologues comparées mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique); d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

[0023] Plus généralement, par "séquence d'acides aminés homologue", on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID N°2, N°4, N°6, N°8, N°12 ou N°14 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide isolé et de préférence de la Sakacine G.

[0024] De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est similaire à au moins 85 % de la séquence SEQ ID N°2, N°4, N°6, N°8, N°12 ou N°14, de préférence au moins 95 %.

[0025] L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces ("gaps") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

[0026] L'activité biologique du polypeptide isolé et notamment de la Sakacine G se réfère à sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes indésirables et/ou pathogènes, de préférence de bactéries *Listeria* et plus particulièrement de bactéries *Listeria monocytogenes*.

[0027] La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé, codant pour un polypeptide tel que défini précédemment.

[0028] Plus précisément, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.

[0029] La séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G (3055 pb) a été déterminée. Il s'agit d'un ADN double brin dont le brin 5'-3' est représenté en séquence ID N°15. Le brin 3'-5' est présenté en figure 2. La présente invention vise également un acide nucléique comprenant une telle séquence.

[0030] Comme décrit précédemment, cette séquence possède trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1*, *skgA2* et *skgDc* et un tronqué, *skgl*. Les gènes supposés *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgl* (SEQ ID N°5) y sont orientés en sens inverse par rapport à *skgDc* (SEQ ID N°13).

[0031] Sont également revendiqués dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique de séquence ID N°5, l'acide nucléique de séquence ID N°13 et l'acide nucléique de séquence ID N°7.

[0032] Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme :

EP 1 285 069 B1

- i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 ; ou
- ii) des séquences hybridant avec la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 ou leur séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation, ou
- iii) des séquences codant pour le polypeptide dénommé Sakacine G, tel que défini précédemment.

[0033] De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15, de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %.

[0034] De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent (T_m).

[0035] Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation (Sambrook *et al.*, 1989, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory) :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

[0036] Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

[0037] Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

[0038] Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les pyrimidines.

[0039] Une séquence nucléotidique homologue aux cadres ouverts de lecture représentés en SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 ou N°15 par mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code un polypeptide présentant l'activité biologique de la Sakacine G, comme définie ci-après.

[0040] Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de bactéries autres que *Lactobacillus*, codant pour la Sakacine G.

[0041] Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Les polypeptides de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

[0042] La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique conforme à la présente invention est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide conforme à la présente invention ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique conforme à la présente invention.

[0043] La bactériocine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique conforme à l'invention et de préférence les séquences SEQ ID N°1 et/ou N°3 où une séquence homologue est transférée dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

[0044] La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour la Sakacine G, peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte

cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à répllication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

[0045] Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également partie de la présente invention.

[0046] L'invention vise en outre les cellules hôtes transformées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, de préférence procaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la répllication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transférée.

[0047] Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des bactéries telles que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* et les levures.

[0048] Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7, N°9, N°13 et/ou N°15. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

[0049] Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

[0050] La présente invention se rapporte également à un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans un environnement qui peut être alimentaire ou non et qui est susceptible d'être contaminé avec les *Listeria monocytogenes*.

[0051] Les *Listeria monocytogenes* sont des microorganismes pathogènes qui sont à l'origine de sévères maladies chez les êtres humains et animaux et qui peuvent notamment être facilement transmissibles par des aliments contaminés, plus spécialement au moyen de viandes, de produits carnés, de produits marins, de lait et de produits dérivés. La présente invention propose donc un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans un aliment susceptible de contenir des *Listeria monocytogenes* à titre de contaminant, ledit procédé comprenant l'addition d'un polypeptide conforme à l'invention dans ledit aliment en une quantité suffisante pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*.

[0052] Les bactériocines conformes à l'invention sont de préférence utilisées dans tout système alimentaire en une quantité comprise entre 1 et 100000 unités arbitraires (AU) de bactériocines par gramme d'aliment.

[0053] Une AU de bactériocines est définie comme 5 µl de la dilution la plus élevée du surnageant de culture conduisant à une zone définie d'inhibition de croissance par rapport à une souche témoin d'une bactérie à Gram positif sur un milieu agar.

[0054] Bien que les aliments soient les plus concernés par une contamination par *Listeria monocytogenes*, les produits vétérinaires et médicaux peuvent également être contaminés avec ce type de bactéries, de même que les produits cosmétiques ou produits apparentés.

[0055] Les bactériocines conformes à la présente invention, et notamment la Sakacine G, sont donc également utiles pour inhiber la croissance de ce type de pathogènes dans ces produits.

[0056] La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'une bactériocine conforme à la présente invention comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables notamment dans la préparation de produits alimentaires et plus précisément pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

[0057] Le polypeptide peut être incorporé tel quel dans le produit alimentaire considéré ou encore y être produit à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

[0058] La présente invention a ainsi également pour objet l'utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans un produit alimentaire pour y générer un polypeptide bactériocine conforme à l'invention.

[0059] L'invention concerne encore une composition bactériocine, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide conforme à la présente invention, c'est-à-dire issue de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 ou comprenant la séquence SEQ ID N°2, ou N°4, ou N°12, ou N°14 ou la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

[0060] L'invention s'étend également à l'utilisation de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 destinée à produire un polypeptide tel que défini plus haut, pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans des produits alimentaires ainsi que les compositions comportant de telle souche.

[0061] Les exemples et la figure ci-après sont présentés à titre illustratif de l'objet de la présente invention.

FIGURE :**[0062]**

- 5 Figure 1 : Représentation schématique du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G.
 Figure 2 : Brin complémentaire 3'-5' correspondant à la séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G et dont le brin 5'-3' est présenté en SEQ ID N°15.

MATERIELS ET METHODES**[0063]**

- Souches bactériennes et milieux de culture. *Lactobacillus sakei* 2512 est cultivée à 30°C en milieu MRS (DIFCO Laboratories) stérilisé 12 min à 110°C. Les souches indicatrices sont cultivées en milieu BHI ("brain-heart infusion"; DIFCO Laboratories) à 37°C.
- Test d'activité. Du milieu BHI, gélosé à 10g/l, estensemencé à 1 % par une préculture de souche indicatrice en phase stationnaire avant d'être coulé en boîte de Petri. Cinquante microlitres de solution de sakacine G sont déposés dans des puits creusés dans la gélose refroidie à l'emporte pièce. L'activité bactériocine se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après incubation une nuit à 37°C.
- Analyse protéique. La sakacine G est analysée en spectrométrie de masse sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165 équipé d'une source d'ionisation par ionspray. Après lyophilisation, la fraction HPLC active est reprise avec une solution acétonitrile / eau (1:1) contenant 0,1% d'acide formique puis injectée par infusion à un débit de 5 µl/min. La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique au moyen du kit BCA (Sigma) selon les instructions du fabricant.
- Les comparaisons de séquences protéiques sont réalisées grâce au programme BLAST (1), accessible à partir du serveur ExPASy du "Swiss Institute of Bioinformatics".
- Clonage moléculaire et transformation. Les plasmides sont extraits et purifiés à partir de souches d'*Escherichia coli* et de *Lactobacillus sakei* 2512 selon les méthodes décrites précédemment par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory et Muriana et Klaenhammer, 1987, Appl. Environ. Microbiol., 53 :553-560 respectivement.

- [0064]** Les enzymes de restriction et de modification de l'ADN sont utilisées selon les indications du fournisseur (Gibco-BRL). Les électrophorèses en gel d'agarose, analytique et préparative, sont conduites en tampon Tris/borate/EDTA (pH 8,3) selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Les fragments d'ADN digérés sont purifiés à partir des gels d'agarose en utilisant le kit "Prep-a-Gene" (Bio-Rad). Les clonages dans les plasmides pGEM-T (Promega) et pZERO2 (Invitrogen) sont réalisés selon les recommandations des fournisseurs. Le transfert de type Southern est réalisé sur membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) selon Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Le transfert est suivi d'une hybridation avec une sonde radioactive obtenue par marquage au ³²P à l'aide du kit "random primers DNA labelling system" (Gibco-BRL). Les bactéries *E. coli* sont rendues compétentes et transformées selon la méthode de Hanahan, 1983. J. Mol. Biol. 166:557-80.

- [0065]** La Taq polymérase (Gibco-BRL) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. L'amplification du fragment d'ADN codant la Sakacine G a été réalisée à l'aide d'un appareil "Geneamp 9700®" (Perkin-Elmer) selon les conditions suivantes : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 1 min suivis d'un cycle supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min.

- [0066]** Le fragment d'ADN portant le locus sakacine G est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique ABI Prism 310® (Perkin-Elmer) en utilisant le kit de séquençage "Big-dye terminator®" (Perkin-Elmer) et les amorces nucléotidiques appropriées.

EXEMPLE 1 :

- 50 **Isolément et purification de la Sakacine G.**

- [0067]** Une culture de 16 h de *Lactobacillus sakei* 2512 (100 ml) est centrifugée à 6000g pendant 15 min. Le surnageant de culture est ensuite chauffé à 70°C pendant 20 min. Le surnageant refroidi est ensuite dilué avec 1 volume d'eau (le pH de la solution diluée doit être inférieur à 6, par addition d'HCl 1M si nécessaire) avant d'être passé sur une colonne (2,5 x 18 cm) contenant une résine échangeuse de cations (carboxy-méthyl cellulose; Cellufine C-200, Amicon) équilibrée avec de l'eau. Après des lavages successifs avec de l'eau (100 ml) puis une solution de NaCl 0,1M (150 ml), la Sakacine G est éluée avec une solution de NaCl 0,5M (200 ml). Le pH de toutes les solutions doit être inférieur à 6. La fraction

active est ensuite déposée sur cartouche d'extraction en phase solide (Sep-pak plus C18, Waters) équilibrée dans l'eau. Après lavages successifs avec 5 ml de solutions d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile, la Sakacine G est éluée avec 10 ml d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 80% d'acétonitrile. Après lyophilisation, l'extrait est solubilisé dans 1 ml de solution aqueuse d'acétonitrile à 40% puis injecté sur une colonne HPLC analytique de phase inverse en C8 (Kromasil, 5µm, 100 Å, 4.6 x 250 mm, A.I.T.). L'HPLC a été réalisée sur un appareillage comprenant une pompe Perkin-Elmer series 200 LC connectée à un détecteur Perkin-Elmer 785A. Le chromatogramme en absorption est enregistré à 220 nm. La séparation est réalisée, à un débit de 0,8 ml/min selon le gradient suivant : Solvant A = eau/acide trifluoroacétique 0,1%; solvant B = acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique 0,07%. Après un lavage de 5 min avec 20% de solvant B, l'élution est réalisée par un gradient de 20 de 40% de solvant B en 10 min puis de 40 à 55% de solvant B en 20 min.

[0068] La fraction correspondant au pic à 23 min s'étant révélée active contre *Listeria ivanovii* BUG 496 a été analysée en spectrométrie de masse en ionisation "ionspray". La molécule apparaît pure à au moins 95% et possède une masse moléculaire de $3834,32 \pm 0,31$ Da. La quantité de Sakacine G ainsi purifiée a été estimée à 120 µg à partir de 100 ml de culture. Le rendement de purification a été estimé à 55% d'activité retrouvée. Une partie de la séquence primaire de la Sakacine G a été déterminée par microséquençage et deux oligonucléotides dégénérés ont été établis à partir de cette séquence.

EXEMPLE 2 :

Clonage du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G

[0069] Par génétique inverse, deux oligonucléotides dégénérés SakG01 (5' AARTATTATGGNAAYGGNGT 3') (SEQ ID N°10) et SakG02S (5' ACATGATGNCNCNCRTTNGC 3') (SEQ ID N°11) ont été choisis afin d'amplifier le fragment d'ADN correspondant au gène de structure de la sakacine G mature (SEQ ID N°15) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'amplifiat ainsi obtenu, d'une taille approximative de 100 pb a été cloné dans le plasmide pGEM-T pour former le plasmide pJMBYC01. Le fragment de restriction *PvuII* de 560 pb issu de pJMBYC01, incluant le fragment inséré, a servi de sonde d'hybridation, lors d'un transfert de type Southern, pour localiser le gène de structure sur le génome de *Lactobacillus sakei* 2512. A partir d'un extrait plasmidique de *Lb. sakei* 2512 digéré par les enzymes de restriction *HindIII* et *EcoRI*, la sonde a révélé des fragments de tailles respectives d'environ 2,1 et 9 kpb. Le fragment *HindIII* de 2,1 kpb a été purifié puis inséré dans le vecteur pZERO2 pour donner le plasmide pJMBYC02. La présence du gène de structure de la sakacine G dans pJMBYC02 a été démontrée par amplification PCR avec les amorces SakG01 et SakG02 puis par séquençage nucléotidique du fragment inséré dans pJMBYC02. Une stratégie voisine a été utilisée afin de déterminer la séquence complète du gène *skgD*. L'extrait plasmidique de *Lb. sakei* 2512 a été digéré par *XbaI*. Le produit de digestion a été inséré dans le plasmide pBluescript SK+. Les clones porteurs de la séquence d'intérêt ont été révélés au moyen d'une sonde radioactive préparée par PCR réalisée sur le plasmide pJMBYC02 à l'aide des oligonucléotides SakG03 (5' CCTTGGTCAGGCTATCG 3') (SEQ ID N°16) et SakG04 (5' ATCACTTTT-TGAATTACCC 3') (SEQ ID N°17).

[0070] L'analyse de la séquence nucléotidique complète de la région (3051 pb) a révélé l'existence de trois cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et *skgDc* et d'un tronqué, *skgI*. Les gènes supposés *skgA1* *skgA2* et *skgI* sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD*.

[0071] Chacun des cadres ouverts de lecture est précédé d'un site potentiel de fixation des ribosomes. Les gènes *skgA1* et *skgA2* codent tous les deux des protéines de 55 résidus d'acides aminés dont les séquences 19-55 sont totalement identiques. La séquence 19-52 correspond à la séquence de la sakacine G obtenue par microséquençage. La présence de 4 résidus cystéine en positions 9, 14 et 24 et C-terminale est à noter. De plus, la masse moléculaire calculée de ce peptide, de 3838,2 Da qui diffère de la masse moléculaire mesurée (3834,32 Da) de 4 Da montre la présence de deux ponts disulfures sur la sakacine G, comme cela a déjà été démontré pour d'autres bactériocines anti-*Listeria*.

[0072] Les séquences 1-18 des protéines *SkG1* et *SkG2* ne diffèrent que de 3 résidus et présentent de fortes homologies avec les peptides "leader" des bactériocines de classe II, qui sont impliquées dans le transport de ces peptides par des ABC-transporteurs spécifiques. En particulier le motif GG terminal est caractéristique de ces séquences leader et constitue le site de maturation de ces bactériocines. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes *skgA1* et *skgA2* montre également une identité de séquence de plus de 95% pour la partie des gènes codant la bactériocine mature.

[0073] Le cadre de lecture ouvert incomplet appelé *skgI* code une protéine de 52 résidus. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données montre de fortes homologies de *SkG1* avec les protéines dites d'immunité *LecI* et *MesI*. L'implication de *MesI* dans la protection vis à vis de la mésoentéricine Y105 a été démontrée. On peut supposer que *skgI* code la protéine d'immunité à la sakacine G.

Le dernier gène *skgDc* code une protéine de 727 acides aminés. D'après les banques de données, *SkGdc* est très

EP 1 285 069 B1

homologue de protéines de la famille des ABC-transporteurs et plus particulièrement des transporteurs de la pediocine PA-1 : PedD ou PapD (Marugg et al., 1992; Appl Environ Microbiol 58, 2360-7; Motlagh et al., 1994, Lett Appl Microbiol 18, 305-12), de la sakacine P : SppT (Huhne et al., 1996, Microbiology 142, 1437-48), de la sakacine A : SapT (Axelsson and Holck, 1995, J Bacteriol 177, 2125-37) et de la mésentéricine Y105: MesD (Fremaux et al., 1995, Microbiology 141, 1637-45).

EXEMPLE 3 :

Spectre d'inhibition.

[0074] La sensibilité à la Sakacine G de 17 souches bactériennes a été testée par la méthode de test en puits (cf Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

	Rayon des halos d'inhibition (mm)
<i>Lc. lactis</i> ATCC 11454	0
<i>Ln. Paramesenteroides</i> DSM 20288	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20484	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20240	0
<i>Lb. Delbrueckii</i> DSM 20081	0
<i>Lb. Plantarum</i> DSM 20174	0
<i>Lb. brevis</i> DSM 20054	0
<i>Lb. casei</i> DSM 20011	0
<i>Lb. sakei</i> 2515	1
<i>P. acidilactici</i> ENSAIA 583	0
<i>P. cerevisiae</i> IP 5492	1
<i>E. faecium</i> ENSAIA, 631	0
<i>E. faecalis</i> IP 5430	2
<i>E. faecalis</i> ENSAIA 636	1
<i>E. durans</i> ENSAIA 630	2
<i>L. innocua</i> 8811	3
<i>L. ivanovi</i> BUG 496	6

[0075] Le spectre d'inhibition de cette bactériocine apparaît comme assez étroit et limité aux souches de *Lactobacillus sakei* et *Pediococcus cerevisiae* pour les bactéries lactiques. Ce peptide apparaît, comme les autres bactériocines de classe IIa, actif contre toutes les souches de *Listeria* testées, ainsi que contre les *Enterococcus faecalis* et *durans* mais pas contre *Enterococcus faecium*.

LISTE DE SEQUENCES

[0076]

<110> RHODIA CHIMIE

<120> BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

<130>

<140>

<141>

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.1

EP 1 285 069 B1

<210> 1
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake
 5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(187)
 10
 <400> 1

 ttaacaggag gtattcaaa atg aag aat aca cgt agc tta acg atc caa gaa 52
 Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu
 1 5 10
 15
 ata aaa tcc atc aca ggt ggt aaa tac tat ggt aat ggt gtt agc tgt 100
 Ile Lys Ser Ile Thr Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys
 15 20 25
 20
 aac tct cat ggt tgt tca gta aat tgg ggg caa gca tgg act tgt ggg 148
 Asn Ser His Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly
 30 35 40
 25
 gta aat cat cta gct aat ggc ggt cat ggg gtt tgt taa ttatttaaa 196
 Val Asn His Leu Ala Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 45 50 55

 <210> 2
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake
 30
 <400> 2
 35
 Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu Ile Lys Ser Ile Thr
 1 5 10 15
 40
 Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys
 20 25 30
 Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala
 35 40 45
 45
 Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 50 55

 50
 <210> 3
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake
 55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(187)

EP 1 285 069 B1

<400> 3

5 taatttggag atgttcttt atg aaa aac gca aaa agc cta aca att caa gaa 52
Met Lys Asn Ala Lys Ser Leu Thr Ile Gln Glu
1 5 10

10 atg aaa tct att aca ggt ggt aaa tac tat ggt aat ggc gtt agc tgt 100
Met Lys Ser Ile Thr Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys
15 20 25

15 aac tct cac ggc tgt tca gta aat tgg ggg caa gca tgg act tgt gga 148
Asn Ser His Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly
30 35 40

20 gta aac cat cta gct aat ggc ggt cat gga gtt tgt taa ttaccagat 196
Val Asn His Leu Ala Asn Gly Gly His Gly Val Cys
45 50 55

<210> 4

20 <211> 55

<212> PRT

<213> Lactobacillus sake

<400> 4

25 Met Lys Asn Ala Lys Ser Leu Thr Ile Gln Glu Met Lys Ser Ile Thr
1 5 10 15

30 Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys
20 25 30

Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala
35 40 45

35 Asn Gly Gly His Gly Val Cys
50 55

<210> 5

40 <211> 181

<212> ADN

<213> Lactobacillus sake

<220>

45 <221> CDS

<222> (24) .. (179)

<400> 5

50 ttaaaaaagg agacgtgatt aaa atg gca aac aaa gac aat att aaa act gaa 53
Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu
1 5 10

55

EP 1 285 069 B1

tct aaa aac aac atc gaa gct ctc ttg cac tta cta gaa aag cgt cct 101
 Ser Lys Asn Asn Ile Glu Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro
 15 20 25
 gta aaa tcc agt gaa tta ctc gat att att gac gtt ctt tcc caa gtt 149
 Val Lys Ser Ser Glu Leu Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val
 30 35 40
 tat agc aaa att gat ata gct aag aat ccc ga 181
 Tyr Ser Lys Ile Asp Ile Ala Lys Asn Pro
 45 50
 <210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake
 <400> 6
 Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu Ser Lys Asn Asn Ile Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro Val Lys Ser Ser Glu Leu
 20 25 30
 Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Ile Asp Ile
 35 40 45
 Ala Lys Asn Pro
 50
 <210> 7
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake
 <220>
 <221> CDS
 <222> (20) .. (1201)
 <400> 7

EP 1 285 069 B1

aaattaggag acttatata ttg ttt aat ctg ttg aga tac aaa aaa tta tat 52
 Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr
 1 5 10

5 tgt tca caa gtg gat gaa gat gat tgt gga atc gca gct ttg aat atg 100
 Cys Ser Gln Val Asp Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met
 15 20 25

10 att ttt aaa aat ttt ggt tcc gaa tat tca cta tca aaa ttg cga ttc 148
 Ile Phe Lys Asn Phe Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe
 30 35 40

15 tta gca aaa acc agt caa caa ggg act act att ttt gga ctg ata aag 196
 Leu Ala Lys Thr Ser Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys
 45 50 55

gct gca gag gaa cta aat tta gaa gcg aat gca tta caa gct gat atg 244

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 1 285 069 B1

	Ala	Ala	Glu	Glu	Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Asp	Met	
	60					65					70					75	
5	ggc	atc	ttt	aaa	gat	gaa	aat	tta	atg	cta	cca	atc	att	gaa	aat	gtt	292
	Gly	Ile	Phe	Lys	Asp	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Pro	Ile	Ile	Ala	His	Val	
					80					85					90		
10	tta	aag	caa	gga	aaa	gtt	ctg	cat	tac	tac	gtt	gta	ttt	gat	gtt	tog	340
	Leu	Lys	Gln	Gly	Lys	Val	Leu	His	Tyr	Tyr	Val	Val	Phe	Asp	Val	Ser	
				95					100					105			
15	aaa	gac	ttt	tta	att	att	ggt	gac	cca	gac	cca	aca	ata	gga	att	acg	388
	Lys	Asp	Phe	Leu	Ile	Ile	Gly	Asp	Pro	Asp	Pro	Thr	Ile	Gly	Ile	Thr	
				110				115					120				
20	gaa	atc	tcc	aaa	aag	gat	ttt	gaa	aat	gaa	tgg	acg	ggt	aat	ttc	ata	436
	Glu	Ile	Ser	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Asn	Glu	Trp	Thr	Gly	Asn	Phe	Ile	
				125				130				135					
25	aca	ttt	tca	aaa	gga	aag	aac	ttt	gtt	tca	gag	aaq	cag	aga	aat	aac	484
	Thr	Phe	Ser	Lys	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Ser	Glu	Lys	Gln	Arg	Asn	Asn	
				140			145				150					155	
30	agt	tta	ctc	aag	ttt	att	cct	att	ttg	aga	cag	caa	aaa	tcc	cta	ata	532
	Ser	Leu	Leu	Lys	Phe	Ile	Pro	Ile	Leu	Arg	Gln	Gln	Lys	Ser	Leu	Ile	
				160					165						170		
35	ttc	tgg	ata	gct	ttc	gcc	gca	ata	cta	ttg	atg	ata	att	agt	att	gca	580
	Phe	Trp	Ile	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Met	Ile	Ile	Ser	Ile	Ala	
				175				180						185			
40	gga	tca	ctt	ttt	tta	gaa	caa	ctt	gta	gat	ata	tat	ata	cca	cac	aaa	628
	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Glu	Gln	Leu	Val	Asp	Ile	Tyr	Ile	Pro	His	Lys	
				190				195					200				
45	aat	atg	gat	aca	ttg	ggg	att	atc	tcg	att	tgc	tta	att	gga	gcc	tat	676
	Asn	Met	Asp	Thr	Leu	Gly	Ile	Ile	Ser	Ile	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Tyr	
				205			210				215						
50	ctt	tta	cag	gcc	gta	atg	acg	tat	ttt	cag	aat	ttt	tta	cta	act	ata	724
	Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	
				220			225				230				235		
55	ttt	gga	caa	aat	ctt	tct	aga	aaa	att	att	tta	aat	tat	att	aat	cac	772
	Phe	Gly	Gln	Asn	Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Asn	Tyr	Ile	Asn	His	
				240					245					250			
60	ctt	ttt	gaa	tta	ccc	atg	tct	ttc	ttc	tca	aca	cgt	aga	gtt	ggc	gaa	820
	Leu	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	
				255				260						265			
65	ata	gtc	tct	cgg	ttt	aca	gat	gca	agc	aag	att	ata	gat	gct	ttg	gca	868
	Ile	Val	Ser	Arg	Phe	Thr	Asp	Ala	Ser	Lys	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Ala	
				270				275				280					
70	agt	acg	att	ttg	act	ctc	ttt	tta	gat	gtt	tgg	atg	ttg	gtt	aca	atc	916
	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Leu	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Leu	Val	Thr	Ile	
				285			290				295						
75	tca	atc	gtt	ctc	gta	ttt	tta	aat	aca	aag	tta	ttt	atg	att	tct	ctg	964
	Ser	Ile	Val	Leu	Val	Phe	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	

EP 1 285 069 B1

	300	305	310	315	
5	gtà tct ata ceg gtg tac tca gtt ata att tat gcg ttt aaa aat aca				1012
	Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr				
		320	325	330	
10	ttt aat ggc ctg aac cat aaa tca atg gaa aat goa goa tta ttg aat				1060
	Phe Asn Gly Leu Asn His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn				
		335	340	345	
15	tct gca ata atc gaa aac gta act ggc ata gaa act gta aaa tca tta				1108
	Ser Ala Ile Ile Glu Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu				
		350	355	360	
20	act tca gaa gaa ttt tcc tac aat caa atc act gat aga ttc gaa aat				1156
	Thr Ser Glu Glu Phe Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn				
		365	370	375	
25	ttt ctt aac agt tcc tta cgg tat acg ata gct gac caa gga cag ca				1203
	Phe Leu Asn Ser Ser Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln				
		380	385	390	
30	<210> 8				
	<211> 394				
	<212> PRT				
	<213> Lactobacillus sake				
35	<400> 8				
40					
45					
50					
55					

EP 1 285 069 B1

Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp
 1 5 10 15
 5 Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser
 35 40 45
 10 Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu
 50 55 60
 Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 15 Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys
 85 90 95
 Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile
 100 105 110
 20 Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys
 115 120 125
 Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly
 130 135 140
 25 Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe
 145 150 155 160
 30 Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe
 165 170 175
 35
 40
 45
 50
 55

EP 1 285 069 B1

Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
180 185 190

5 Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
195 200 205

10 Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Val
210 215 220

Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile Phe Gly Gln Asn Leu
225 230 235 240

15 Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His Leu Phe Glu Leu Pro
245 250 255

Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu Ile Val Ser Arg Phe
260 265 270

20 Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ile Leu Thr
275 280 285

Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile Ser Ile Val Leu Val
290 295 300

25 Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu Val Ser Ile Pro Val
305 310 315 320

30 Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr Phe Asn Gly Leu Asn
325 330 335

His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ile Glu
340 345 350

35 Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Phe
355 360 365

Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn Phe Leu Asn Ser Ser
370 375 380

40 Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln
385 390

45 <210> 9
<211> 2042
<212> ADN
<213> Lactobacillus sake

50 <400> 9

55

EP 1 285 069 B1

agcttcggga ttcttagcta tatcaat ttt gctataaact tgggaaagaa cgtcaataat 60
 atcgagtaaat tcaactggatt ttacaggacg cttttctagt aagtgcaga gagcttcgat 120
 gttgttttta gattcagttt taatattgtc tttgtttgcc attttaata cgtctccttt 180
 5 tttatagtaa taaaaaaac acaattaaat tagtgctttt ttatctggta attaaacaaac 240
 tccatgaccc ccattagcta gatggtttac tccacaagtc catgcttgcc cccaatttac 300
 tgaacagccg tgagagttac agctaacgcc attaccatag tatttaccac ctgtaataga 360
 tttcatttct tgaattgtta ggctttttgc gtttttcata aagaacatct ccaaattata 420
 ttttttagtg attcttgaag ttctgttgta acgcagaatt ttggaagaat gactacttgt 480
 tagaaatttg ccgattttaa taattaacaa acccatgac cgccattagc tagatgattt 540
 10 accccacaag tccatgcttg cccccaattt actgaacaac catgagagtt acagctaaca 600

ccattaccat agtatttacc acctgtgatg gattttattt cttggatcgt taagctacgt 660
 15 gtattcttca ttttgaatac ctctgttaa ataattttta cactgacgt gtagttctaa 720
 tgtgaaattg tgtcaagttt agcaaatata tatttttaggc atggaaaaac ttgcttttaa 780
 ttgacttga ctataacggc ataatactgg tattactata tttgtttagc ttcacaaaaa 840
 aattaggaga cttatatatt gttaaatctg ttgagataga aaaaattata ttgttcacaa 900
 gtggatgaag atgattgtgg aatgcagct ttgaatatga tttttaaaaa ttttggttcc 960
 20 gaatttccac tatcaaaatt gcgattctta gcaaaaacca gtcaacaagg gactactatt 1020
 tttggactga taaaggctgc agaggaacta aatttagaag cgaatgcatt acaagctgat 1080
 atgggcatct ttaaagatga aaatttaattg ctaccaatca ttgcacatgt tttaaagcaa 1140
 ggaaaagttc tgcattacta cgttgatttt gatgtttcga aagacttttt aattattggt 1200
 gaccagacc caacaatagg aattacggaa atctccaaa aggattttga aaatgaatgg 1260
 25 acgggtaatt tcataacatt ttcaaaagga aagaactttg tttcagagaa gcagagaaat 1320
 aacagtttac tcaagtttat tcttattttg agacagcaaa aatccctaatt attctggata 1380
 gctttcgcgc caatactatt gatgataatt agtattgcag gatcactttt tttagaacaa 1420
 cttgtagata tatatatacc acacaaaaat atggatacat tggggattat ctcgatttgc 1500
 ttaattggag cctatctttt acaggccgta atgacgtatt ttcagaattt tttactaaact 1560
 30 atatttggac aaaatctttc tagaaaaatt attttaaatt atattaatca cttttttgaa 1620
 ttaccatgt ctttcttctc aacacgtaga gttggcgaaa tagtctctcg gtttacagat 1680
 gcaagcaaga ttatagatgc tttggcaagt acgattttga ctctcttttt agatgtttgg 1740
 atgttggta caatctcaat cgttctcgta tttttaaata caaagttatt tatgatttct 1800
 ctggtatcta tacgggtgta ctcagttata atttatgcgt ttaaaaatac atttaattggc 1860
 35 ctgaaccata aatcaatgga aaatgcagca ttattgaatt ctgcaataat cgaaaacgta 1920
 actggcatag aaactgtaaa atcattaact tcagaagaat tttcctacaa tcaaatcact 1980
 gatagattcg aaaattttct taacagttcc ttacggtata cgatagctga ccaaggacag 2040
 ca 2042

40
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake
 45
 <400> 10
 aarlattatg gnaayggngt 20
 50
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake
 55
 <400> 11
 acatgatgnc cncorttngc 20
 <210> 12
 <211> 37

EP 1 285 069 B1

<212> PRT

<213> Lactobacillus sake

<400> 12

5

Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys Ser Val
1 5 10 15

10

Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala Asn Gly
20 25 30

Gly His Gly Val Cys
35

15

<210> 13

<211> 2214

20

<212> ADN

<213> lactobacillus sake

<220>

<221> CDS

25

<222> (20) .. (2200)

<400> 13

30

35

40

45

50

55

EP 1 285 069 B1

	aaattaggag acttatata ttg ttt aat ctg ttg aga tac aaa aaa tta tat	52
	Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr	
	1 5 10	
5	tgt tca caa gtg gat gaa gat gat tgt gga atc gca gct ttg aat atg	100
	Cys Ser Gln Val Asp Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met	
	15 20 25	
10	att ttt aaa aat ttt ggt tcc gaa tat tca cta tca aaa ttg cga ttc	148
	Ile Phe Lys Asn Phe Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe	
	30 35 40	
15	tta gca aaa acc agt caa caa ggg act act att ttt gga ctg ata aag	196
	Leu Ala Lys Thr Ser Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys	
	45 50 55	
20	gct gca gag gaa cta aat tta gaa gcg aat gca tta caa gct gat atg	244
	Ala Ala Glu Glu Leu Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met	
	60 65 70 75	
25	ggc atc ttt aaa gat gaa aat tta atg cta cca atc att gca cat gtt	292
	Gly Ile Phe Lys Asp Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val	
	80 85 90	
30	tta aag caa gga aaa gtt ctg cat tac tac gtt gta ttt gat gtt tcg	340
	Leu Lys Gln Gly Lys Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser	
	95 100 105	
35	aaa gac ttt tta att att ggt gac cca gac cca aca ata gga att acg	388
	Lys Asp Phe Leu Ile Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr	
	110 115 120	
40	gaa atc tcc aaa aag gat ttt gaa aat gaa tgg acg ggt aat ttc ata	436
	Glu Ile Ser Lys Lys Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile	
	125 130 135	
45	aca ttt tca aaa gga aag aac ttt gtt tca gag aag cag aga aat aac	484
	Thr Phe Ser Lys Gly Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn	
	140 145 150 155	
50	agt tta ctc aag ttt att cct att ttg aga cag caa aaa tcc cta ata	532
	Ser Leu Leu Lys Phe Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile	
	160 165 170	
55	ttc tgg ata gct ttc gcc gca ata cta ttg atg ata att agt att gca	580
	Phe Trp Ile Ala Phe Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala	
	175 180 185	
60	gga tca ctt ttt tta gaa caa ctt gta gat ata tat ata cca cac aaa	628
	Gly Ser Leu Phe Leu Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys	
	190 195 200	

EP 1 285 069 B1

5	aat atg gat aca ttg ggg att atc tcg att tgc tta att gga gcc tat Asn Met Asp Thr Leu Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr 203 210 215	676
10	ctt tta cag gcc gta atg acg tat ttt cag aat ttt tta cta act ata Leu Leu Gln Ala Val Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile 220 225 230 235	724
15	ttt gga caa aat ctt tct aga aaa att att tta aat tat att aat cac Phe Gly Gln Asn Leu Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His 240 245 250	772
20	ctt ttt gaa tta ccc atg tct ttc ttc tca aca cgt aga gtt ggc gaa Leu Phe Glu Leu Pro Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu 255 260 265	820
25	ata gtc tct cgg ttt aca gat gca agc aag att ata gat gct ttg gca Ile Val Ser Arg Phe Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala 270 275 280	868
30	agt acg att ttg act ctc ttt tta gat gtt tgg atg ttg gtt aca atc Ser Thr Ile Leu Thr Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile 285 290 295	916
35	tca atc gtt ctc gta ttt tta aat aca aag tta ttt atg att tct ctg Ser Ile Val Leu Val Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu 300 305 310 315	964
40	gta tct ata cgg gtg tac tca gtt ata att tat gcg ttt aaa aat aca Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr 320 325 330	1012
45	ttt aat ggc ctg aac cat aaa tca atg gaa aat gca gca tta ttg aat Phe Asn Gly Leu Asn His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn 335 340 345	1060
50	tct gca ata atc gaa aac gta act ggc ata gaa act gta aaa tca tta Ser Ala Ile Ile Glu Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu 350 355 360	1108
55	act tca gaa gaa ttt tcc tac aat caa atc act gat aga ttc gaa aat Thr Ser Glu Glu Phe Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn 365 370 375	1156
60	ttt ctt aac agt tcc tta cgg tat acg ata gct gac caa gga cag caa Phe Leu Asn Ser Ser Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln Gln 380 385 390 395	1204
65	gct tta aaa gtg ggt ttg aag cta att ctt ata gtc ttt atc tta tgg Ala Leu Lys Val Gly Leu Lys Leu Ile Leu Ile Val Phe Ile Leu Trp 400 405 410	1252
70	gct gga gca atc caa gtt atg agg ggg aat ctc aca gtc gga aga tta Ala Gly Ala Ile Gln Val Met Arg Gly Asn Leu Thr Val Gly Arg Leu 415 420 425	1300
75	ttg gct ttt aat gct tta gta aca tac ttt tta aat ccc tta gag aat Leu Ala Phe Asn Ala Leu Val Thr Tyr Phe Leu Asn Pro Leu Glu Asn 430 435 440	1348

EP 1 285 069 B1

	att att aat tta caa cca aag cta caa act gca aga gtc gct aat att	1396
	Ile Ile Asn Leu Gln Pro Lys Leu Gln Thr Ala Arg Val Ala Asn Ile	
	445 450 455	
5	aga cta aat gaa gta tta tta gtg gat tct gag ttt aat agg ggg gga	1444
	Arg Leu Asn Glu Val Leu Leu Val Asp Ser Glu Phe Asn Arg Gly Gly	
	460 465 470 475	
10	cgc gac agc tca aca aac tta aat ggg gat atc gta ttt caa gat gta	1492
	Arg Asp Ser Ser Thr Asn Leu Asn Gly Asp Ile Val Phe Gln Asp Val	
	480 485 490	
15	gaa ttt agt tat ggt tac gga tgc aac gta ttg cac aac atc aat ata	1540
	Glu Phe Ser Tyr Gly Tyr Gly Ser Asn Val Leu His Asn Ile Asn Ile	
	495 500 505	
	aaa ata caa aag aat agt agt aca acg att gtt ggt atg agc ggt tct	1588
	Lys Ile Gln Lys Asn Ser Ser Thr Thr Ile Val Gly Met Ser Gly Ser	
	510 515 520	
20	ggg aaa tcc aca tta gca aaa tta atg gtt ggt ttc tat caa gcc gga	1636
	Gly Lys Ser Thr Leu Ala Lys Leu Met Val Gly Phe Tyr Gln Ala Gly	
	525 530 535	
25	tca gga caa ata tta tta aat ggt aaa tta atc gat aac att gat cgt	1684
	Ser Gly Gln Ile Leu Leu Asn Gly Lys Leu Ile Asp Asn Ile Asp Arg	
	540 545 550 555	
30	cat gcc ctg aga caa tgc att acg tat gta cca cag gaa ccg gta atg	1732
	His Ala Leu Arg Gln Ser Ile Thr Tyr Val Pro Gln Glu Pro Val Met	
	560 565 570	
	ttc gca ggt aca att tta gaa aat ctt att atg cag aat aaa aga aat	1780
	Phe Ala Gly Thr Ile Leu Glu Asn Leu Ile Met Gln Asn Lys Arg Asn	
	575 580 585	
35	tta tct att gat aaa gtg aaa gag gca tgt agg ata gcc gaa att gat	1828
	Leu Ser Ile Asp Lys Val Lys Glu Ala Cys Arg Ile Ala Glu Ile Asp	
	590 595 600	
40	aaa gat ata gaa aat ttt cct atg ggg tat gat aca gat att tcc gaa	1876
	Lys Asp Ile Glu Asn Phe Pro Met Gly Tyr Asp Thr Asp Ile Ser Glu	
	605 610 615	
	cat ggg agt tca atc tca gta ggt caa aaa caa aga ctt tct att gca	1924
	His Gly Ser Ser Ile Ser Val Gly Gln Lys Gln Arg Leu Ser Ile Ala	
	620 625 630 635	
45	aga tca ctg ctg aca gag tct aat gtt tta ctg ttt gat gaa tca acc	1972
	Arg Ser Leu Leu Thr Glu Ser Asn Val Leu Leu Phe Asp Glu Ser Thr	
	640 645 650	
50	agt agt ttg gac act att act gag cag cga ata att gaa aac cta ttg	2020
	Ser Ser Leu Asp Thr Ile Thr Glu Gln Arg Ile Ile Glu Asn Leu Leu	
	655 660 665	
55	aat tta aat gac aaa aca tta ata ttc gtt gca cat cga ttg tca gtt	2068
	Asn Leu Asn Asp Lys Thr Leu Ile Phe Val Ala His Arg Leu Ser Val	
	670 675 680	

EP 1 285 069 B1

	gct aag caa act gaa aat att atc gtt atg gat cac ggt gga att gtt	2116
	Ala Lys Gln Thr Glu Asn Ile Ile Val Met Asp His Gly Gly Ile Val	
	685 690 695	
5		
	gaa aca ggt tct cat gat aaa tta ata ttg gaa aat gga tat tat aaa	2164
	Glu Thr Gly Ser His Asp Lys Leu Ile Leu Glu Asn Gly Tyr Tyr Lys	
	700 705 710 715	
10		
	gaa tta tgt act gtg aag acg aag aaa aaa gaa ttt tagataaaaac aaaa	2214
	Glu Leu Cys Thr Val Lys Thr Lys Lys Lys Glu Phe	
	720 725	
15	<210> 14	
	<211> 727	
	<212> PRT	
	<213> lactobacillus sake	
20	<400> 14	
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		

EP 1 285 069 B1

Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp
 1 5 10 15
 5 Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe
 20 25 30
 Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser
 35 40 45
 10 Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu
 50 55 60
 Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp
 65 70 75 80
 15 Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys
 85 90 95
 Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile
 100 105 110
 20 Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys
 115 120 125
 Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly
 130 135 140
 25 Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe
 145 150 155 160
 Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe
 165 170 175
 30 Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
 180 185 190
 35 Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
 195 200 205
 Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Glu Ala Val
 210 215 220
 40
 45
 50
 55

EP 1 285 069 B1

	Met	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Phe	Leu	Leu	Thr	Ile	Phe	Gly	Gln	Asn	Leu
	225					230					235					240
5	Ser	Arg	Lys	Ile	Ile	Leu	Asn	Tyr	Ile	Asn	His	Leu	Phe	Glu	Leu	Pro
					245					250					255	
	Met	Ser	Phe	Phe	Ser	Thr	Arg	Arg	Val	Gly	Glu	Ile	Val	Ser	Arg	Phe
				260					265					270		
10	Thr	Asp	Ala	Ser	Lys	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Ala	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr
			275					280					285			
	Leu	Phe	Leu	Asp	Val	Trp	Met	Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Ile	Val	Leu	Val
		290					295					300				
15	Phe	Leu	Asn	Thr	Lys	Leu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	Val	Ser	Ile	Pro	Val
	305					310					315				320	
	Tyr	Ser	Val	Ile	Ile	Tyr	Ala	Phe	Lys	Asn	Thr	Phe	Asn	Gly	Leu	Asn
				325						330					335	
20	His	Lys	Ser	Met	Glu	Asn	Ala	Ala	Leu	Leu	Asn	Ser	Ala	Ile	Ile	Glu
				340					345					350		
	Asn	Val	Thr	Gly	Ile	Glu	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Glu	Phe
25			355				360					365				
	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ile	Thr	Asp	Arg	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	Asn	Ser	Ser
		370				375						380				
	Leu	Arg	Tyr	Thr	Ile	Ala	Asp	Gln	Gly	Gln	Gln	Ala	Leu	Lys	Val	Gly
30		385				390				395						400
	Leu	Lys	Leu	Ile	Leu	Ile	Val	Phe	Ile	Leu	Trp	Ala	Gly	Ala	Ile	Gln
				405						410					415	
35	Val	Met	Arg	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Phe	Asn	Ala
				420					425					430		
	Leu	Val	Thr	Tyr	Phe	Leu	Asn	Pro	Leu	Glu	Asn	Ile	Ile	Asn	Leu	Gln
		435					440					445				
40	Pro	Lys	Leu	Gln	Thr	Ala	Arg	Val	Ala	Asn	Ile	Arg	Leu	Asn	Glu	Val
		450					455					460				
	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Glu	Phe	Asn	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr
45		465				470				475					480	
	Asn	Leu	Asn	Gly	Asp	Ile	Val	Phe	Gln	Asp	Val	Glu	Phe	Ser	Tyr	Gly
				485					490						495	
	Tyr	Gly	Ser	Asn	Val	Leu	His	Asn	Ile	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Asn
50				500				505						510		
	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu
			515					520					525			
55	Ala	Lys	Leu	Met	Val	Gly	Phe	Tyr	Gln	Ala	Gly	Ser	Gly	Gln	Ile	Leu
		530					535					540				

EP 1 285 069 B1

Leu Asn Gly Lys Leu Ile Asp Asn Ile Asp Arg His Ala Leu Arg Gln
 545 550 555 560
 5 Ser Ile Thr Tyr Val Pro Gln Glu Pro Val Met Phe Ala Gly Thr Ile
 565 570 575
 Leu Glu Asn Leu Ile Met Gln Asn Lys Arg Asn Leu Ser Ile Asp Lys
 580 585 590
 10 Val Lys Glu Ala Cys Arg Ile Ala Glu Ile Asp Lys Asp Ile Glu Asn
 595 600 605
 Phe Pro Met Gly Tyr Asp Thr Asp Ile Ser Glu His Gly Ser Ser Ile
 610 615 620
 15 Ser Val Gly Gln Lys Gln Arg Leu Ser Ile Ala Arg Ser Leu Leu Thr
 625 630 635 640
 Glu Ser Asn Val Leu Leu Phe Asp Glu Ser Thr Ser Ser Leu Asp Thr
 645 650 655
 Ile Thr Glu Gln Arg Ile Ile Glu Asn Leu Leu Asn Leu Asn Asp Lys
 660 665 670
 25 Thr Leu Ile Phe Val Ala His Arg Leu Ser Val Ala Lys Gln Thr Glu
 675 680 685
 Asn Ile Ile Val Met Asp His Gly Gly Ile Val Glu Thr Gly Ser His
 690 695 700
 30 Asp Lys Leu Ile Leu Glu Asn Gly Tyr Tyr Lys Glu Leu Cys Thr Val
 705 710 715 720
 Lys Thr Lys Lys Lys Glu Phe
 725
 35

<210> 15

<211> 3055

40 <212> ADN

<213> lactobacillus sake

<400> 15

45

50

55

EP 1 285 069 B1

agcttcggga ttcttagcta tatcaatttt gctataaact tgggaaagaa cgtcaataat 60
 atcagagtaat tcactggatt ttacaggacg cttttctagt aagtgcaga gagcttcgat 120
 gttgttttta gattcagttt taatattgtc tttgtttgcc attttaatca cgtctccttt 180
 5 tttatagtaa taaaaaaac acaattaaat tagtgctttt ttatctggta attaacaac 240
 tccatgaccg ccattagcta gatggtttac tccacaagtc catgcttgcc cccaatttac 300
 tgaacagccg tgagagttac agctaacgcc attaccatag tatttaccac ctgtaataga 360
 tttcatttct tgaattgtta ggctttttgc gtttttcata aagaacatct ccaattata 420
 ttttttagtg attcttgag ttctgttgta acgcagaatt ttggaagaat gagtacttgt 480
 tagaaatttg ccgattttaa taattaacaa accccatgac cgccattagc tagatgattt 540
 10 accccacaag tccatgcttg cccccaattt actgaacaac catgagagtt acagctaaca 600
 ccattaccat agtatttacc acctgtgatg gattttattt cttggatcgt taagctacgt 660
 gtattcttca ttttgaatac ctccgtgttaa ataattttta cagcatcagt gtagtcttaa 720
 tgtgaaattg tgtcaagttt agcaaatata tatttttaggc atggaaaaac ttgcttttaa 780
 ttcgacttga ctataacggt ataatactgg tattactata tttgtttagc ttcacaaaaa 840
 15 aattaggaga ottatatatt gtttaattctg ttgagataoa aaaaattata ttgttcacaa 900
 gtggatgaag atgattgtgg aatcgcagct ttgaatatga tttttaaaaa ttttggttcc 960
 gaatttccac tatcaaaatt gcgattctta gcaaaaacca gtcaacaagg gactactatt 1020

 20
 tttggactga taaaggctgc agaggaacta aatttagaag cgaatgcatt acaagctgat 1080
 atgggcatct ttaaagatga aaatttaatg ctaccaatca ttgcacatgt tttaaagcaa 1140
 ggaaaagttc tgcattacta cgttgtattt gatgtttcga aagacttttt aattattggt 1200
 25 gaccagacc caacaatagg aattacggaa atctccaaa aggattttga aaatgaatgg 1260
 acgggtaatt tcataacatt ttcaaaaagg aagaactttg tttcagagaa gcagagaaat 1320
 aacogtttaa tcaagtttat toctattttg agaaagaaaa aatooctaat attotggata 1380
 gctttcgccg caatactatt gatgataatt agtattgcag gatcactttt tttagaacaa 1440
 ctttgtagata tatatatacc acacaaaaat atggatacat tggggattat ctcgatttgc 1500
 ttaattggag cctatctttt acaggccgta atgacgtatt ttcagaattt tttactaact 1560
 30 atatttggac aaaatctttc tagaaaaatt attttaaatt atattaatca cctttttgaa 1620
 ttaccatgt ctttcttctc aacacgtaga gttggcgaaa tagtctctcg gtttacagat 1680
 gcaagcaaga ttatagatgc tttggcaagt acgattttga ctctcttttt agatgtttgg 1740
 atgttggtta caatctcaat cgttctcgta tttttaaata caaagttatt tatgatttct 1800
 ctggtatcta taccggtgta ctacgttata atttatgcgt ttaaaaatac atttaatggc 1860
 35 ctgaaccata aatcaatgga aatgcagca ttattgaatt ctgcaataat cgaaaacgta 1920
 actggcatag aaactgtaaa atcattact tcagaagaat tttcctacaa tcaaatcact 1980
 gatagattcg aaaattttct taacagttcc ttacggtata cgatagctga ccaaggacag 2040
 caagctttaa aagtgggttt gaagctaatt cttatagtct ttatcttatg ggctggagca 2100
 atccaagtta tgagggggaa tctcacagtc ggaagattat tggtttttaa tgcttttagta 2160
 40 acatactttt taaatccctt agagaatatt attaatttac aaccaaagct acaaaactgca 2220
 agagtgccta atattagact aaatgaagta ttattagtgg attctgagtt taataggggg 2280
 ggacgcgaca gctcaacaaa cttaaatggg gatatcgtat ttcaagatgt agaatttagt 2340
 tatggttacg gatcgacgt attgcacaac atcaatataa aaatacaaaa gaatagtagt 2400
 acaacgattg ttggtatgag cggttctggg aaatccacat tagcaaaatt aatggttgg 2460
 45 ttctatoaag ooggatcagg acaaatatta ttaaattgta aattaatoga taaattgat 2520
 cgtcatgccc tgagacaatc gattacgtat gtaccacagg aaccggtaat gttcgcagg 2580
 acaatttttag aaaatcttat tatgcagaat aaaagaaatt tatctattga taaagtga 2640
 gaggcattga ggatagccga aattgataaa gatatagaaa attttctat ggggtatgat 2700
 acagatattt ccgaacatgg gagtccaatc tcagttagtc aaaaaaag actttctatt 2760
 50 gcaagatcac tgctgacaga gtctaattgt ttactgtttg atgaatcaac cagtgtttg 2820
 gacactatta ctgagcagcg aataattgaa aacctattga atttaaatga caaaacatta 2880
 atattcgttg cacatcgatt gtcagttgct aagcaactg aaaaattat cgttatggat 2940
 cacggtggaa ttgttgaaac aggttcgcat gataaattaa tattggaaaa tggatattat 3000
 aaagaattat gtactgtgaa gacgaagaaa aaagaatttt agataaaaca aaaac 3055

 55

<210> 16

<211> 17

EP 1 285 069 B1

<212> ADN
<213> lactobacillus sake

5 <400> 16
ccttggtcag gctatcg 17

10 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> lactobacillus sake

<400> 17
atcacctttt tgaattacc 20

15

Revendications

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine, dénommée Sakacine G de séquence ID N°12, issue de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 déposée auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le numéro I-2479.
2. Polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine de classe IIa.
3. Pré-bactériocine isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4 ou pré-bactériocine homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°2 ou N°4.
4. Bactériocine isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ID N°12 ou bactériocine homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°12.
5. Acide nucléique de séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4.
6. Acide nucléique selon la revendication 5, de séquence ID N°1 et/ou de séquence ID N°3 ou acide nucléique homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°1 ou N°3.
7. Acide nucléique selon la revendication 5, de séquence d'acide nucléique SEQ ID N°15 ou acide nucléique homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°15.
8. Acide nucléique selon la revendication 5, de séquence d'acide nucléique SEQ ID N°9 ou acide nucléique homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°9.
9. Protéine d'immunité isolée, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ID N°6 ou protéine d'immunité homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°6.
10. ABC-transporteur isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°14 ou ABC-transporteur homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°14.
11. Acide nucléique de séquence ID N°5 ou acide nucléique homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°5, codant pour un polypeptide selon la revendication 9.
12. Acide nucléique de séquence ID N°13 ou acide nucléique homologue de séquence similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°13, codant pour un polypeptide selon la revendication 10.
13. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 8, 11, 12.
14. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 13.
15. Cellule hôte selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un microorganisme choisi parmi les *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* ou d'une levure.

EP 1 285 069 B1

16. Procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 8, 11, 12 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture des conditions permettant l'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4 et 9 à 10.
- 5 17. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.
18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en oeuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria* dans les produits alimentaires.
- 10 19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en oeuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires.
20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisée en ce que ledit polypeptide est produit dans le produit alimentaire à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 déposée auprès de la CNCM sous le numéro I-2479.
- 15 21. Utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 déposée auprès de la CNCM sous le numéro I-2479 dans des produits alimentaires pour y produire un polypeptide bactériocine selon l'une des revendications 1 à 4.
- 20 22. Composition bactériocine caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou la souche de *Lactobacillus Sakei* 2512 déposée auprès de la CNCM sous le numéro I-2479.

25 Claims

1. Isolated polypeptide, characterised in that it is a bacteriocin, named Sakacin G of sequence ID No. 12, derived from the strain *Lactobacillus sakei* 2512 deposited with the Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) under deposit number I-2479.
- 30 2. Isolated polypeptide according to claim 1, characterised in that it is a class IIa bacteriocin.
3. Isolated pre-bacteriocin, characterised in that it comprises sequence ID No. 2 and/or sequence ID No. 4 or homologous pre-bacteriocin of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 2 or 4.
- 35 4. Isolated bacteriocin, characterised in that it comprises sequence ID No. 12 or homologous bacteriocin of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 12.
- 40 5. Nucleic acid of a nucleotide sequence encoding a polypeptide according to any one of claims 1 to 4.
6. Nucleic acid according to claim 5, of sequence ID No. 1 and/or sequence ID No. 3 or homologous nucleic acid of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 1 or 3.
- 45 7. Nucleic acid according to claim 5, of nucleic acid sequence SEQ ID No. 15 or homologous nucleic acid of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 15.
8. Nucleic acid according to claim 5, of nucleic acid sequence SEQ ID No. 9 or homologous nucleic acid of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 9.
- 50 9. Isolated immunity protein, characterised in that it comprises sequence ID No. 6 or homologous immunity protein of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 6.
10. Isolated ABC transporter, characterised in that it comprises sequence ID No. 14 or homologous ABC transporter of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 14.
- 55 11. Nucleic acid of sequence ID No. 5 or homologous nucleic acid of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 5, encoding a polypeptide according to claim 9.

EP 1 285 069 B1

12. Nucleic acid of sequence ID No. 13 or homologous nucleic acid of sequence similar to at least 70% of sequence ID No. 13, encoding a polypeptide according to claim 10.
13. Cloning and/or expression vector comprising a nucleic acid according to any one of claims 5 to 8, 11, 12.
14. Host cell transformed by a vector according to claim 13.
15. Host cell according to claim 14, **characterised in that** it is a microorganism chosen among *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* or a yeast.
16. Process for the production of a recombinant polypeptide, in which a vector comprising a nucleic acid according to any one of claims 5 to 8, 11, 12 is transferred into a host cell which is cultured under conditions permitting the expression of a polypeptide according to any one of claims 1 to 4 and 9 to 10.
17. Use of a polypeptide according to any one of claims 1 to 4 as an active agent against pathogenic or undesirable flora in the preparation of food products.
18. Use according to claim 17, **characterised in that** said polypeptide is used to inhibit the growth and propagation of *Listeria* in food products.
19. Use according to claim 18, **characterised in that** said polypeptide is used to inhibit the growth and propagation of *Listeria monocytogenes* in food products.
20. Use according to any one of claims claim 17 to 19, **characterised in that** said polypeptide is produced in the food product from the strain *Lactobacillus sakei* 2512 deposited with the CNCM under deposit number I-2479.
21. Use of the strain *Lactobacillus sakei* 2512 deposited with the CNCM under deposit number I-2479 in food products to produce therein a bacteriocin polypeptide according to any one of claims 1 to 4.
22. Bacteriocin composition, **characterised in that** it comprises at least one polypeptide according to any one of claims 1 to 4 or the strain *Lactobacillus sakei* 2512 deposited with the CNCM under deposit number I-2479.

Patentansprüche

1. Isoliertes Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um ein Bacteriocin, Sakacine G genannt, mit der Sequenz ID NO: 12 handelt, das von dem Stamm *Lactobacillus sakei* 2512 stammt, der bei der Collection Nationale des Cultures de Microorganismes (CNCM) unter der Nr. I-2479 hinterlegt wurde.
2. Isoliertes Polypeptid nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um ein Bacteriocin der Klasse IIa handelt.
3. Isoliertes Pre-Bacteriocin, **dadurch gekennzeichnet, daß** es die Sequenz SEQ ID NO: 2 und/oder die Sequenz SEQ ID NO:4 oder homologes Pre-Bacteriocin mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:2 oder NO:4 umfaßt.
4. Isoliertes Bacteriocin, **dadurch gekennzeichnet, daß** es die SEQ ID NO:12 oder homologes Bacteriocin mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:12 umfaßt.
5. Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz, die für ein Polypeptid nach den Ansprüchen 1 bis 4 codiert.
6. Nukleinsäure nach Anspruch 5 mit der Sequenz SEQ ID NO:1 und/oder mit der Sequenz SEQ ID NO:3 oder homologe Nukleinsäure mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:1 oder NO:3.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 5 mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:15 oder homologe Nukleinsäure mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:15.
8. Nukleinsäure nach Anspruch 5 mit der Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO:9 oder homologe Nukleinsäure mit einer

EP 1 285 069 B1

Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:9.

- 5
9. Isoliertes Immunitätsprotein, **dadurch gekennzeichnet, daß** es die Sequenz SEQ ID NO:6 oder homologes Immunitätsprotein mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:6 umfaßt.
- 10
10. Isolierter ABC-Transporter, **dadurch gekennzeichnet, daß** er die Sequenz SEQ ID NO:14 oder einen homologen ABC-Transporter mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:14 umfaßt.
11. Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ ID NO:5 oder homologe Nukleinsäure mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:5, die für ein Polypeptid nach Anspruch 9 codiert.
12. Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ ID NO:13 oder homologe Nukleinsäure mit einer Sequenz mit wenigstens 70 % Similarität zu der Sequenz SEQ ID NO:13, die für ein Polypeptid nach Anspruch 10 codiert.
- 15
13. Klonierungs- und/oder Expressionsvektor, der eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 8, 11, 12 umfaßt.
14. Wirtszelle, die mit einem Vektor nach Anspruch 13 transformiert ist.
15. Wirtszelle nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, daß** es sich um einen Mikroorganismus, ausgewählt unter Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Pediococcus, Escherichia und einer Hefe handelt.
- 20
16. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids, in dem ein Vektor, der eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 5 bis 8, 11, 12 umfaßt, in eine Wirtszelle transferiert wird, die unter Bedingungen kultiviert wird, welche die Expression eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 9 bis 10 erlauben.
- 25
17. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Wirkstoff gegen pathogene oder unerwünschte Flora bei der Herstellung von Lebensmittelprodukten.
18. Verwendung nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Polypeptid verwendet wird, um das Wachstum und die Vermehrung von Listeria in Lebensmittelprodukten zu inhibieren.
- 30
19. Verwendung nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Peptid verwendet wird, um das Wachstum und die Vermehrung von Listeria monocytogenes in Lebensmittelprodukten zu inhibieren.
- 35
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Polypeptid in dem Lebensmittelprodukt durch den Stamm Lactobacillus sakei 2512, der bei der CNCM unter der Nr. I-2479 hinterlegt wurde, produziert wird.
- 40
21. Verwendung des Stamms Lactobacillus sakei 2512, der bei der CNCM unter der Nr. I-2479 hinterlegt wurde, in Lebensmittelprodukten, um dort Bacteriocin-Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zu produzieren.
- 45
22. Bacteriocin-Zusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet, daß** sie wenigstens ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder den Stamm Lactobacillus sakei 2512, der bei der CNCM unter der Nr. I-2479 hinterlegt wurde, umfaßt.

50

55

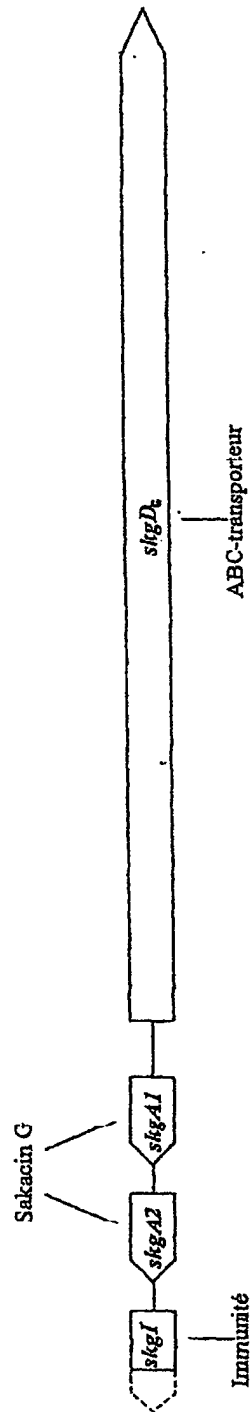


FIG.1

[illegible]

FIG. 2

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne pouvant être exclues, l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Littérature non-brevet citée dans la description

- ENNAHAR S. et al. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 24, 85-106 [0003]
- JACK R. et al. *Microbiol. Rev.*, 1995, vol. 59 (2), 171-200 [0003]
- DUFFES F. et al. *J. Food Prot.*, 1999, vol. 62 (12), 1394-1403 [0003]
- TAGG J.R. et al. *Bacteriol. Rev.*, 1976, vol. 40, 722-756 [0006]
- HUGAS et al. *Food Microbiol.*, 1998, vol. 15, 639-650 [0007]
- MURIANA ; KLAENHAMMER. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, vol. 53, 553-560 [0063]
- HANAHAN. *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 166, 557-80 [0064]
- MARUGG et al. *Appl Environ Microbiol.* 1992, vol. 58, 2360-7 [0073]
- MOTLAGH et al. *Lett Appl Microbiol.* 1994, vol. 18, 305-12 [0073]
- HUHNE et al. *Microbiology*, 1996, vol. 142, 1437-48 [0073]
- HOLCK. *J Bacteriol.* 1995, vol. 177, 2125-37 [0073]
- FREMAUX et al. *Microbiology*, 1995, vol. 141, 1637-45 [0073]